



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 101 12 107.5
Anmeldetag: 14. März 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stäm-
men der Familie Enterobacteriaceae
Priorität: 04.11.2000 DE 100 54 748.6
IPC: C 12 N, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. Oktober 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

4-15



#5

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Mechthild RIEPING et al.

GAU:

SERIAL NO: 10/076,416

EXAMINER:

FILED: FEBRUARY 19, 2002

#5

FOR: PROCESS FOR THE FERMENTATIVE PREPARATION OF L-AMINO ACIDS USING STRAINS OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
GERMANY	101 12 107.5	MARCH 14, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

William E. Beaumont
Registration No. 30,996



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-Lysin und L-Valin, unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das *poxB*-Gen abgeschwächt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-Lysin und L-Valin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Serratia marcescens*, herzustellen. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-

Aminosäuren produzierender Stämme der Familie Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, L-Lysin und L-Valin, bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Threonin produzieren, und in denen die für das Enzym Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierende Nukleotidsequenz (poxB-Gen) abgeschwächt wird.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- 30 a) Fermentation von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen zumindest das poxB-Gen abgeschwächt wird,

b) Anreicherung der entsprechenden L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, und

c) Isolieren der gewünschten L-Aminosäure.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um
- 10 Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia
- 15 insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli TF427
- 20 Escherichia coli H4578
- Escherichia coli KY10935
- Escherichia coli VNIIgenetika MG442
- Escherichia coli VNIIgenetika M1
- Escherichia coli VNIIgenetika 472T23
- 25 Escherichia coli BKIIM B-3996
- Escherichia coli kat 13
- Escherichia coli KCCM-10132

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind

30 beispielsweise

- Serratia marcescens HNr21
- Serratia marcescens TLR156
- Serratia marcescens T2000

L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen α -Amino- β -

5 Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen α -Methylserin, Resistenz gegen Diaminobernsteinsäure, Resistenz gegen α -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie

10 beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich

15 Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen

20 L-Serin, Resistenz gegen L-Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Verstärkung des Threonin-Operons, Verstärkung der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I

25 bevorzugt der feed back resistenten Form, Verstärkung der Homoserinkinase, Verstärkung der Threoninsynthase, Verstärkung der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-

30 Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Verstärkung der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Verstärkung der Transhydrogenase, Verstärkung des RhtB-Genproduktes, Verstärkung des RhtC-Genproduktes, Verstärkung des YfiK-Genproduktes, Verstärkung einer Pyruvat-Carboxylase, und

35 Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden poxB-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

Darüber hinaus wurde gefunden, daß Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Abschwächung, insbesondere Ausschaltung des für die Pyruvat-Oxidase (EC 1.2.2.2) kodierenden poxB-Gens geringere Konzentrationen des unerwünschten Nebenproduktes Essigsäure bilden.

Die Nukleotidsequenz des poxB-Gens von Escherichia coli wurde von Grabau und Cronan (Nucleic Acids Research. 14 (13), 5449-5460 (1986)) publiziert und kann ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277, 1453 - 1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von Escherichia coli unter der Accession Number AE000188 entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des poxB-Gens von Escherichia coli ist in SEQ ID No. 1 und die Aminosäuresequenz des dazugehörigen Genproduktes in SEQ ID No. 2 dargestellt.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen poxB-Gene können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele des poxB-Gens verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“) ergeben.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression des poxB-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch

Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren.

- 5 Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15, 58-64 (1999), Franch und Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3, 159-164
10 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft,
15 Weinheim, Deutschland, 1990).

- Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological
20 Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, 5511-5515 (1998), Wentz und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266, 20833-20839 (1991) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und
25 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

- Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von
30 der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu
35 Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“),

die dazu führen, daß falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen das *poxB*-Gen von *Escherichia coli* durch ortsspezifische Mutagenese abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet werden kann, ist das Plasmid pMAK705Δ*poxB* (Figur 1). Es enthält neben Resten von Polylinkersequenzen lediglich einen Teil der 5'- und einen Teil der 3'-Region des *poxB*-Gens. Ein 340 bp langer Abschnitt der Kodierregion fehlt (Deletion). Die Sequenz dieser für die Mutagenese des *poxB*-Gens einsetzbaren DNA ist in SEQ ID No. 3 dargestellt.

Die Deletionsmutation des *poxB*-Gens kann durch Gen- bzw. Allelaustausch in geeignete Stämme eingebaut werden.

Eine gebräuchliche Methode ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622 (1989)) beschriebene Methode des Genaustauschs mit Hilfe eines konditional replizierenden pSC101-Derivates pMAK705. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 1999, 7143-7148 (1999)) oder die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)) können gleichfalls benutzt werden.

Nach erfolgtem Austausch liegt in dem betreffenden Stamm die in SEQ ID No. 4 dargestellte Form des Δ poxB-Allels vor, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist.

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen im poxB-Gen oder
5 Mutationen, die die Expression des poxB-Gens betreffen, durch Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie
10 Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des poxB-Gens ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-
15 Phosphat zu verstärken.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man
20 beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 25 So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),
 - 30 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen (DE-A-19 831 609),

- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231:332 (1992)),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31:279-283 (1984)),
- 5 • die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158:647-653 (1986)),
- das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),
- 10 • das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (DE 100 348 33.5),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- 15 • das für den Threoninexport kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (DE 100 264 94.8) und
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983))

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- 20 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des poxB-Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen 25 (Ravnikar und Somerville, Journal of Bacteriology 169, 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Vogel et al., Archives in Microbiology 149, 36-42 (1987)),

- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa
(Accession Number AAC77180 des National Center for
Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA),
 - das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP
5 (Accession Number AAC77179 des National Center for
Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA) und
 - das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende pckA-Gen (Medina et al. (Journal of
Bacteriology 172, 7151-7156 (1990))
- 10 abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die
Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur
Abschwächung des poxB-Gens unerwünschte Nebenreaktionen
15 auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing
Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products,
Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London,
UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im
20 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch
(Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren
(repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine
Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im
Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die
25 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und
periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
30 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der

American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

- Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, 5 Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden.
- 10 Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff 15 oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, 20 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können 25 essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder 30 in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem

5 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise

10 bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

15 Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie

20 bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes DH5 α /pMAK705 wurde am 12. September 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ,

25 Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13720 hinterlegt.

Eine Reinkultur des Escherichia coli K-12 Stammes MG442 Δ poxB wurde am 02. Oktober 2000 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ,

30 Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag als DSM 13762 hinterlegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie z.B. L-Threonin, L-

Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

- 5 Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung werden nach Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) durchgeführt. Die Transformation
10 von Escherichia coli wird, wenn nicht anders beschrieben, nach Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA (1989) 86: 2172-2175) durchgeführt.

- Die Bebrütungstemperatur bei der Herstellung von Stämmen
15 und Transformanten ist 37°C. Bei dem Genaustauschverfahren nach Hamilton et. al werden Temperaturen von 30°C und 44°C verwendet.

Beispiel 1

Konstruktion der Deletionsmutation des poxB-Gens

- 20 Teile der 5'- und 3'-Region des poxB-Gens werden aus Escherichia coli K12 unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukletidsequenz des poxB-Gens in E. coli K12 MG1655 (SEQ ID No. 1) werden folgende
25 PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'5'-2: 5' - AGGCCTGGAATAACGCAGCAGTTG - 3'

poxB'3'-1: 5' - CTGCGTGCATTGCTTCCATTG - 3'

- 30 poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „Qiagen Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 500 Basenpaare (bp) grosses DNA-Fragment aus der 5'-Region des
5 poxB-Gens (mit poxB1 bezeichnet) und ein ca. 750 bp grosses DNA-Fragment aus der 3'-Region des poxB-Gens (mit poxB2 bezeichnet) kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic
10 Press) mit der Taq-DNA-Polymerase (Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland) amplifiziert werden. Die PCR-Produkte werden den Herstellerangaben entsprechend jeweils mit dem Vektor pCR2.1TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und in den E. coli Stamm TOP10F⁺
15 transformiert.

Die Selektion Plasmid tragender Zellen erfolgt auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist. Nach der Plasmid DNA Isolierung wird der Vektor pCR2.1TOPOpoxB1 mit den Restriktionsenzymen Ecl136II und XbaI gespalten und das
20 poxB1-Fragment nach der Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Der Vektor pCR2.1TOPOpoxB2 wird nach der Plasmid DNA Isolierung mit den Enzymen EcoRV und XbaI gespalten und mit dem isolierten poxB1-Fragment ligiert.
25 Der E. coli Stamm DH5α wird mit dem Ligationsansatz transformiert und Plasmid tragende Zellen auf LB Agar, der mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt ist, selektioniert. Nach der Plasmid DNA Isolierung werden durch die Kontrollspaltung mit den Enzymen HindIII und XbaI solche
30 Plasmide nachgewiesen, in denen die in SEQ ID No. 3 dargestellte mutagene DNA Sequenz kloniert vorliegt. Eines der Plasmide wird als pCR2.1TOPOΔpoxB bezeichnet.

Beispiel 2Konstruktion des Austauschvektors pMAK705 Δ poxB

Das in Beispiel 1 beschriebene poxB-Allel wird aus dem Vektor pCR2.1TOPO Δ poxB nach der Restriktion mit den Enzymen
5 HindIII und XbaI und Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel isoliert und mit dem Plasmid pMAK705 (Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622), das mit den Enzymen HindIII und XbaI verdaut wurde, ligiert. Der Ligationsansatz wird in DH5 α transformiert und Plasmid
10 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Chloramphenicol versetzt ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung wird nach Plasmid DNA Isolierung und Spaltung mit den Enzymen HindIII und XbaI nachgewiesen. Der entstandene Austauschvektor pMAK705 Δ poxB (=
15 pMAK705 Δ poxB) ist in Figur 1 dargestellt.

Beispiel 3

Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm MG442

Der L-Threonin produzierende E. coli Stamm MG442 ist in der
20 Patentschrift US-A- 4,278,765 beschrieben und bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) als CMIM B-1628 hinterlegt.

Für den Austausch des chromosomalen poxB-Gens gegen das
25 Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird MG442 mit dem Plasmid pMAK705 Δ poxB transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden
30 (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC -3'

Der erhaltene Stamm wird als MG442ΔpoxB bezeichnet.

Beispiel 4

5 Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442ΔpoxB

MG442ΔpoxB wird auf Minimalmedium mit der folgenden Zusammensetzung vermehrt: 3,5 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l NH_4Cl , 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l Glucose, 20 g/l Agar. Die Bildung von L-Threonin wird in batch Kulturen

- 10 von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem
- 15 ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 µl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose) überimpft und für 48 Stunden bei
- 20 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

- Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-
- 25 Threonin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 Δ poxB	4,9	2,6

Beispiel 5

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm

5 MG442 Δ poxB/pMW218gdhA

5.1 Amplifizierung und Klonierung des gdhA-Gens

Das Glutamat-Dehydrogenase-Gen aus *Escherichia coli* K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert.

10 Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das gdhA-Gen in *E. coli* K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000270 und Nr. AE000271) werden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

Gdh1: 5' - TGAACACTTCTGGCGGTACG - 3'

15 Gdh2: 5' - CCTCGGCGAAGCTAATATGG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale *E. coli* K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 2150 bp großes DNA-Fragment, das den gdhA-Kodierbereich und ca. 20 350 bp 5'-flankierende und ca. 450 bp 3'-flankierende Sequenzen umfaßt, kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, 25 USA) amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wird in das

Plasmid pCR2.1TOPO kloniert und in den E. coli Stamm TOP10 transformiert (Invitrogen, Leek, Niederlande, Produktbeschreibung TOPO TA Cloning Kit, Cat. No. K4500-01). Die erfolgreiche Klonierung wird durch Spaltung des
5 Plasmids pCR2.1TOPOgdhA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und EcoRV nachgewiesen. Dazu wird die Plasmid DNA mittels des „QIAprep Spin Plasmid Kits“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert und nach der Spaltung in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

10 5.2 Klonierung des gdhA-Gens in den Plasmidvektor pMW218

Das Plasmid pCR2.1TOPOgdhA wird mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und das 2,1 kbp große gdhA-Fragment mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden,
15 Deutschland) isoliert. Das Plasmid pMW218 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym EcoRI gespalten und mit dem gdhA-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem Ligationsansatz transformiert und pMW218 tragende Zellen durch Ausplattieren auf LB Agar (Lennox, Virology
20 1955, 1: 190), der mit 20 μ g/ml Kanamycin versetzt ist, selektioniert.

Die erfolgreiche Klonierung des gdhA-Gens kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit EcoRI und EcoRV nachgewiesen werden. Das Plasmid wird als pMW218gdhA
25 (Figur 2) bezeichnet.

5.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ poxB/pMW218gdhA

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ poxB und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW218gdhA transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml
30 Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ poxB/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA.

5.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ poxB/pMW218gdhA und MG442/pMW218gdhA wird wie in Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das Vorkulturmedium werden bei diesen beiden Stämmen zusätzlich mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 2 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

Tabelle 2

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442 Δ poxB	4,9	2,6
MG442/pMW218gdhA	5,6	2,6
MG442 Δ poxB/pMW218gdhA	5,5	2,9

10

Beispiel 6

Herstellung von L-Threonin mit dem Stamm MG442 Δ poxB/pMW219rhtC

6.1 Amplifizierung des rhtC-Gens

- 15 Das rhtC-Gen aus Escherichia coli K12 wird unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sowie synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert. Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das rhtC-Gen in E. coli K12 MG1655 (GenBank: Accession Nr. AE000458, Zakataeva et al. (FEBS Letters 452, 228-232 (1999)) werden PCR-Primer
- 20 synthetisiert (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland):

RhtC1: 5' - CTGTTAGCATCGGCGAGGCA - 3'

RhtC2: 5' - GCATGTTGATGGCGATGACG - 3'

Die für die PCR eingesetzte chromosomale E. coli K12 MG1655 DNA wird nach Herstellerangaben mit „QIAGEN Genomic-tips 5 100/G“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Ein ca. 800 bp großes DNA-Fragment kann mit den spezifischen Primern unter Standard-PCR-Bedingungen (Innis et al.: PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Pfu-DNA Polymerase (Promega 10 Corporation, Madison, USA) amplifiziert werden.

6.2 Klonierung des rhtC-Gens in den Plasmidvektor pMW219

Das Plasmid pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japan) wird mit dem Enzym SmaI gespalten und mit dem rhtC-PCR-Fragment ligiert. Der E. coli Stamm DH5 α wird mit dem 15 Ligationsansatz transformiert und pMW219 tragende Zellen auf LB Agar, der mit 20 μ g/ml Kanamycin supplementiert ist, selektioniert. Die erfolgreiche Klonierung kann nach der Plasmid DNA-Isolierung und Kontrollspaltung mit KpnI, HindIII und NcoI nachgewiesen werden. Das Plasmid 20 pMW219rhtC ist in Figur 3 dargestellt.

6.3 Herstellung des Stammes MG442 Δ poxB/pMW219rhtC

Der in Beispiel 3 erhaltene Stamm MG442 Δ poxB und der Stamm MG442 werden mit dem Plasmid pMW219rhtC transformiert und Transformanten auf LB-Agar selektioniert, der mit 20 μ g/ml 25 Kanamycin supplementiert ist. Auf diese Weise entstehen die Stämme MG442 Δ poxB/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC.

6.4 Herstellung von L-Threonin

Die Herstellung von L-Threonin durch die Stämme MG442 Δ poxB/pMW219rhtC und MG442/pMW219rhtC wird wie in 30 Beispiel 4 beschrieben geprüft. Das Minimalmedium und das

Vorkulturmedium werden bei diesen beiden Stämmen zusätzlich mit 20 µg/ml Kanamycin supplementiert.

In Tabelle 3 ist das Ergebnis des Versuches zusammengefasst.

5

Tabelle 3

Stamm	OD (660 nm)	L-Threonin g/l
MG442	6,0	1,5
MG442ΔpoxB	4,9	2,6
MG442/pMW219rhtC	5,2	2,9
MG442ΔpoxB/pMW219rhtC	5,4	3,9

Beispiel 7

Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm TOC21R

- 10 Der L-Lysin produzierende E. coli Stamm pDA1/TOC21R ist in der Patentanmeldung F-A-2511032 beschrieben und bei der Collection Nationale de Culture de Microorganisme (CNCM, Institut Pasteur, Paris, Frankreich) unter der Nummer I-167 hinterlegt. Der Stamm und der plasmidfreie Wirt sind
- 15 ebenfalls bei Dauce-Le Reverend et al. (European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 15:227-231 (1982)) unter der Bezeichnung TOC21/pDA1 beschrieben.

- Von Stamm pDA1/TOC21R wird nach Kultur im Antibiotika-freien LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein
- 20 Derivat isoliert, das das Plasmid pDA1 nicht mehr enthält. Der entstandene Stamm ist Tetracyclin-sensitiv und wird als TOC21R bezeichnet.

Für den Austausch des chromosomalen *poxB*-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird TOC21R mit dem Plasmid pMAK705 Δ *poxB* (Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) 5 Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

10 *poxB*'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC -3'

Der erhaltene Stamm wird als TOC21R Δ *poxB* bezeichnet.

Beispiel 8

Herstellung von L-Lysin mit dem Stamm TOC21R Δ *poxB*

- 15 Die Bildung von L-Lysin durch die Stämme TOC21R Δ *poxB* und TOC21R wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l
- 20 MgSO₄*7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 μ l dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l
- 25 FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄*1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l Glucose, 25 mg/l L-Isoleucin und 5 mg/l Thiamin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin,
- 30 Deutschland) bei einer Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Lysin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem

Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 4 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

5

Tabelle 4

Stamm	OD (660 nm)	L-Lysin g/l
TOC21R	1,0	1,17
TOC21R Δ poxB	1,0	1,29

Beispiel 9

Ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens in dem E. coli Stamm B-1288

- 10 Der L-Valin produzierende E. coli Stamm AJ 11502 ist in der Patentschrift US-A-4391907 beschrieben und bei dem National Center for Agricultural Utilization Research (Peoria, Illinois, USA) als NRRL B-12288 hinterlegt.

- Von Stamm AJ 11502 wird nach Kultur im Antibiotika-freien
15 LB-Medium für ungefähr sechs Generationen ein plasmidfreies Derivat isoliert. Der entstandene Stamm ist Ampicillin-sensitiv und wird als AJ11502kur bezeichnet.

- Für den Austausch des chromosomalen poxB-Gens gegen das Plasmid-kodierte Deletionskonstrukt wird AJ11502kur mit dem
20 Plasmid pMAK705 Δ poxB (Siehe Beispiel 2) transformiert. Der Genaustausch erfolgt mit dem von Hamilton et al. (1989) Journal of Bacteriology 174, 4617 - 4622) beschriebenen Selektionsverfahren und wird durch Standard-PCR-Methoden (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and

Applications, Academic Press) mit folgenden Oligonukleotid Primern verifiziert:

poxB'5'-1: 5' - CTGAACGGTCTTAGTGACAG - 3'

poxB'3'-2: 5' - GCCAGTTCGATCACTTCATCAC -3'

- 5 Der erhaltene Stamm wird als AJ11502kur Δ poxB bezeichnet. Aus Stamm NRRL B-12288 wird das in der Patentschrift US-A-4391907 beschriebene Plasmid isoliert, welches die genetische Information bezüglich der Valin-Produktion trägt. Der Stamm AJ11502kur Δ poxB wird mit diesem Plasmid
- 10 transformiert. Eine der erhaltenen Transformanten wird als B-12288 Δ poxB bezeichnet.

Beispiel 10

Herstellung von L-Valin mit dem Stamm B-12288 Δ poxB

- Die Bildung von L-Valin durch die Stämme B-12288 Δ poxB und
- 15 NRRL B-12288 wird in batch Kulturen von 10 ml, die in 100 ml Erlenmeierkolben enthalten sind, überprüft. Dazu wird 10 ml Vorkulturmedium der folgenden Zusammensetzung: 2 g/l Hefeextrakt, 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l CaCO_3 , 20 g/l Glucose und 50 mg/l
- 20 Ampicillin beimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf einem ESR Inkubator der Firma Kühner AG (Birsfelden, Schweiz) inkubiert. 250 μl dieser Vorkultur werden in 10 ml Produktionsmedium (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 30 g/l
- 25 CaCO_3 , 20 g/l Glucose, 5 mg/l Thiamin und 50 mg/l Ampicillin) überimpft und für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird die optische Dichte (OD) der Kultursuspension mit einem LP2W-Photometer der Firma Dr. Lange (Berlin, Deutschland) bei einer
- 30 Messwellenlänge von 660 nm bestimmt.

Anschließend wird die Konzentration an gebildetem L-Valin im steril filtrierten Kulturüberstand mit einem

Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenreaktion mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 5 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt.

5

Tabelle 5

Stamm	OD (660 nm)	L-Valin g/l
NRRL B-12288	5,7	0,95
B-12288 Δ poxB	5,6	1,05

Beschreibung der Figuren

- Figur 1: pMAK705 Δ poxB (= pMAK705 Δ poxB)
- Figur 2: pMW218gdhA
- 10 • Figur 3: pMW219rhtC

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- cat: Chloramphenicolresistenzgen
- 15 rep-ts: temperatursensitive Replikationsregion des Plasmides pSC101
- poxB1: Teil der 5'-Region des poxB-Gens
- poxB2: Teil der 3'-Region des poxB-Gens
- kan: Kanamycinresistenzgen
- 20 gdhA: Glutamat-Dehydrogenase-Gen
- rhtC: Threoninresistenz vermittelndes Gen

Die Abkürzungen für die Restriktionsenzyme haben folgende Bedeutung:

- BamHI: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus amyloliquefaciens*
- BglII: Restriktionsendonuklease aus *Bacillus globigii*
- ClaI: Restriktionsendonuklease aus *Caryphanon latum*
- 5 • Ecl136II Restriktionsendonuklease aus *Enterobacter cloacae* RFL136 (= Ecl136)
- EcoRI: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- EcoRV: Restriktionsendonuklease aus *Escherichia coli*
- 10 • HindIII: Restriktionsendonuklease aus *Haemophilus influenzae*
- KpnI: Restriktionsendonuklease aus *Klebsiella pneumoniae*
- PstI: Restriktionsendonuklease aus *Providencia stuartii*
- 15 • PvuI: Restriktionsendonuklease aus *Proteus vulgaris*
- SacI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces achromogenes*
- SalI: Restriktionsendonuklease aus *Streptomyces albus*
- SmaI: Restriktionsendonuklease aus *Serratia marcescens*
- 20 • XbaI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas badrii*
- XhoI: Restriktionsendonuklease aus *Xanthomonas holcicola*

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie
Enterobacteriaceae.

10 <130> 000613 BT

<140>

<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1719

20 <212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1716)

<223> poxB

<400> 1

30 atg aaa caa acg gtt gca gct tat atc gcc aaa aca ctc gaa tcg gca 48
Met Lys Gln Thr Val Ala Ala Tyr Ile Ala Lys Thr Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15

35 ggg gtg aaa cgc atc tgg gga gtc aca ggc gac tct ctg aac ggt ctt 96
Gly Val Lys Arg Ile Trp Gly Val Thr Gly Asp Ser Leu Asn Gly Leu
20 25 30

40 agt gac agt ctt aat cgc atg ggc acc atc gag tgg atg tcc acc cgc 144
Ser Asp Ser Leu Asn Arg Met Gly Thr Ile Glu Trp Met Ser Thr Arg
35 40 45

45 cac gaa gaa gtg gcg gcc ttt gcc gct ggc gct gaa gca caa ctt agc 192
His Glu Glu Val Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ala Gln Leu Ser
50 55 60

50 gga gaa ctg gcg gtc tgc gcc gga tgc tgc ggc ccc ggc aac ctg cac 240
Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Gly Ser Cys Gly Pro Gly Asn Leu His
65 70 75 80

55 tta atc aac ggc ctg ttc gat tgc cac cgc aat cac gtt ccg gta ctg 288
Leu Ile Asn Gly Leu Phe Asp Cys His Arg Asn His Val Pro Val Leu
85 90 95

60 gcg att gcc gct cat att ccc tcc agc gaa att ggc agc ggc tat ttc 336
Ala Ile Ala Ala His Ile Pro Ser Ser Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Phe
100 105 110

60 cag gaa acc cac cca caa gag cta ttc cgc gaa tgt agt cac tat tgc 384
Gln Glu Thr His Pro Gln Glu Leu Phe Arg Glu Cys Ser His Tyr Cys
115 120 125

	gag	ctg	gtt	tcc	agc	ccg	gag	cag	atc	cca	caa	gta	ctg	gcg	att	gcc	432
	Glu	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	Gln	Ile	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Ile	Ala	
	130						135					140					
5	atg	cgc	aaa	gcg	gtg	ctt	aac	cgt	ggc	gtt	tcg	gtt	gtc	gtg	tta	cca	480
	Met	Arg	Lys	Ala	Val	Leu	Asn	Arg	Gly	Val	Ser	Val	Val	Val	Leu	Pro	
	145					150					155					160	
10	ggc	gac	gtg	gcg	tta	aaa	cct	gcg	cca	gaa	ggg	gca	acc	atg	cac	tgg	528
	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Lys	Pro	Ala	Pro	Glu	Gly	Ala	Thr	Met	His	Trp	
					165					170					175		
15	tat	cat	gcg	cca	caa	cca	gtc	gtg	acg	ccg	gaa	gaa	gaa	gag	tta	cgc	576
	Tyr	His	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	
				180					185						190		
20	aaa	ctg	gcg	caa	ctg	ctg	cgt	tat	tcc	agc	aat	atc	gcc	ctg	atg	tgt	624
	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asn	Ile	Ala	Leu	Met	Cys	
			195					200					205				
25	ggc	agc	ggc	tgc	gcg	ggg	gcg	cat	aaa	gag	tta	gtt	gag	ttt	gcc	ggg	672
	Gly	Ser	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	His	Lys	Glu	Leu	Val	Glu	Phe	Ala	Gly	
			210				215					220					
30	aaa	att	aaa	gcg	cct	att	gtt	cat	gcc	ctg	cgc	ggg	aaa	gaa	cat	gtc	720
	Lys	Ile	Lys	Ala	Pro	Ile	Val	His	Ala	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	His	Val	
	225					230					235					240	
35	gaa	tac	gat	aat	ccg	tat	gat	gtt	gga	atg	acc	ggg	tta	atc	ggc	ttc	768
	Glu	Tyr	Asp	Asn	Pro	Tyr	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Phe	
					245					250					255		
40	tcg	tca	ggg	ttc	cat	acc	atg	atg	aac	gcc	gac	acg	tta	gtg	cta	ctc	816
	Ser	Ser	Gly	Phe	His	Thr	Met	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	
				260					265					270			
45	ggc	acg	caa	ttt	ccc	tac	cgc	gcc	ttc	tac	ccg	acc	gat	gcc	aaa	atc	864
	Gly	Thr	Gln	Phe	Pro	Tyr	Arg	Ala	Phe	Tyr	Pro	Thr	Asp	Ala	Lys	Ile	
			275					280					285				
50	att	cag	att	gat	atc	aac	cca	gcc	agc	atc	ggc	gct	cac	agc	aag	gtg	912
	Ile	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Ala	His	Ser	Lys	Val	
			290				295					300					
55	gat	atg	gca	ctg	gtc	ggc	gat	atc	aag	tcg	act	ctg	cgt	gca	ttg	ctt	960
	Asp	Met	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Ile	Lys	Ser	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	
	305					310					315					320	
60	cca	ttg	gtg	gaa	gaa	aaa	gcc	gat	cgc	aag	ttt	ctg	gat	aaa	gcg	ctg	1008
	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Lys	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Leu	Asp	Lys	Ala	Leu	
					325					330					335		
65	gaa	gat	tac	cgc	gac	gcc	cgc	aaa	ggg	ctg	gac	gat	tta	gct	aaa	ccg	1056
	Glu	Asp	Tyr	Arg	Asp	Ala	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Lys	Pro	
				340					345					350			
70	agc	gag	aaa	gcc	att	cac	ccg	caa	tat	ctg	gcg	cag	caa	att	agt	cat	1104
	Ser	Glu	Lys	Ala	Ile	His	Pro	Gln	Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Ile	Ser	His	
			355					360					365				

	ttt gcc gcc gat gac gct att ttc acc tgt gac gtt ggt acg cca acg	1152
	Phe Ala Ala Asp Asp Ala Ile Phe Thr Cys Asp Val Gly Thr Pro Thr	
	370 375 380	
5	gtg tgg gcg gca cgt tat cta aaa atg aac ggc aag cgt cgc ctg tta	1200
	Val Trp Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Met Asn Gly Lys Arg Arg Leu Leu	
	385 390 395 400	
10	ggt tcg ttt aac cac ggt tcg atg gct aac gcc atg ccg cag gcg ctg	1248
	Gly Ser Phe Asn His Gly Ser Met Ala Asn Ala Met Pro Gln Ala Leu	
	405 410 415	
15	ggt gcg cag gcg aca gag cca gaa cgt cag gtg gtc gcc atg tgc ggc	1296
	Gly Ala Gln Ala Thr Glu Pro Glu Arg Gln Val Val Ala Met Cys Gly	
	420 425 430	
	gat ggc ggt ttt agc atg ttg atg ggc gat ttc ctc tca gta gtg cag	1344
	Asp Gly Gly Phe Ser Met Leu Met Gly Asp Phe Leu Ser Val Val Gln	
	435 440 445	
20	atg aaa ctg cca gtg aaa att gtc gtc ttt aac aac agc gtg ctg ggc	1392
	Met Lys Leu Pro Val Lys Ile Val Val Phe Asn Asn Ser Val Leu Gly	
	450 455 460	
25	ttt gtg gcg atg gag atg aaa gct ggt ggc tat ttg act gac ggc acc	1440
	Phe Val Ala Met Glu Met Lys Ala Gly Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Thr	
	465 470 475 480	
30	gaa cta cac gac aca aac ttt gcc cgc att gcc gaa gcg tgc ggc att	1488
	Glu Leu His Asp Thr Asn Phe Ala Arg Ile Ala Glu Ala Cys Gly Ile	
	485 490 495	
35	acg ggt atc cgt gta gaa aaa gcg tct gaa gtt gat gaa gcc ctg caa	1536
	Thr Gly Ile Arg Val Glu Lys Ala Ser Glu Val Asp Glu Ala Leu Gln	
	500 505 510	
40	cgc gcc ttc tcc atc gac ggt ccg gtg ttg gtg gat gtg gtg gtc gcc	1584
	Arg Ala Phe Ser Ile Asp Gly Pro Val Leu Val Asp Val Val Val Ala	
	515 520 525	
	aaa gaa gag tta gcc att cca ccg cag atc aaa ctc gaa cag gcc aaa	1632
	Lys Glu Glu Leu Ala Ile Pro Pro Gln Ile Lys Leu Glu Gln Ala Lys	
	530 535 540	
45	ggt ttc agc ctg tat atg ctg cgc gca atc atc agc gga cgc ggt gat	1680
	Gly Phe Ser Leu Tyr Met Leu Arg Ala Ile Ile Ser Gly Arg Gly Asp	
	545 550 555 560	
50	gaa gtg atc gaa ctg gcg aaa aca aac tgg cta agg taa	1719
	Glu Val Ile Glu Leu Ala Lys Thr Asn Trp Leu Arg	
	565 570	
55	<210> 2	
	<211> 572	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	
60	<400> 2	
	Met Lys Gln Thr Val Ala Ala Tyr Ile Ala Lys Thr Leu Glu Ser Ala	
	1 5 10 15	
	Gly Val Lys Arg Ile Trp Gly Val Thr Gly Asp Ser Leu Asn Gly Leu	

	20					25					30					
	Ser	Asp	Ser	Leu	Asn	Arg	Met	Gly	Thr	Ile	Glu	Trp	Met	Ser	Thr	Arg
			35					40					45			
5	His	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Leu	Ser
		50					55					60				
10	Gly	Glu	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Gly	Ser	Cys	Gly	Pro	Gly	Asn	Leu	His
	65					70					75					80
	Leu	Ile	Asn	Gly	Leu	Phe	Asp	Cys	His	Arg	Asn	His	Val	Pro	Val	Leu
					85					90					95	
15	Ala	Ile	Ala	Ala	His	Ile	Pro	Ser	Ser	Glu	Ile	Gly	Ser	Gly	Tyr	Phe
				100					105					110		
	Gln	Glu	Thr	His	Pro	Gln	Glu	Leu	Phe	Arg	Glu	Cys	Ser	His	Tyr	Cys
			115					120					125			
20	Glu	Leu	Val	Ser	Ser	Pro	Glu	Gln	Ile	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Ile	Ala
		130						135				140				
25	Met	Arg	Lys	Ala	Val	Leu	Asn	Arg	Gly	Val	Ser	Val	Val	Val	Leu	Pro
	145					150					155					160
	Gly	Asp	Val	Ala	Leu	Lys	Pro	Ala	Pro	Glu	Gly	Ala	Thr	Met	His	Trp
					165					170					175	
30	Tyr	His	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg
				180					185					190		
	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Arg	Tyr	Ser	Ser	Asn	Ile	Ala	Leu	Met	Cys
			195					200					205			
35	Gly	Ser	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	His	Lys	Glu	Leu	Val	Glu	Phe	Ala	Gly
		210					215					220				
40	Lys	Ile	Lys	Ala	Pro	Ile	Val	His	Ala	Leu	Arg	Gly	Lys	Glu	His	Val
	225					230					235					240
	Glu	Tyr	Asp	Asn	Pro	Tyr	Asp	Val	Gly	Met	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Phe
					245					250					255	
45	Ser	Ser	Gly	Phe	His	Thr	Met	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Leu	Val	Leu	Leu
				260					265					270		
	Gly	Thr	Gln	Phe	Pro	Tyr	Arg	Ala	Phe	Tyr	Pro	Thr	Asp	Ala	Lys	Ile
			275					280					285			
50	Ile	Gln	Ile	Asp	Ile	Asn	Pro	Ala	Ser	Ile	Gly	Ala	His	Ser	Lys	Val
		290					295					300				
55	Asp	Met	Ala	Leu	Val	Gly	Asp	Ile	Lys	Ser	Thr	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu
	305					310					315					320
	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Lys	Ala	Asp	Arg	Lys	Phe	Leu	Asp	Lys	Ala	Leu
					325					330					335	
60	Glu	Asp	Tyr	Arg	Asp	Ala	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Asp	Leu	Ala	Lys	Pro
				340					345					350		
	Ser	Glu	Lys	Ala	Ile	His	Pro	Gln	Tyr	Leu	Ala	Gln	Gln	Ile	Ser	His

	355	360	365
	Phe Ala Ala Asp Asp Ala Ile	Phe Thr Cys Asp Val	Gly Thr Pro Thr
	370	375	380
5	Val Trp Ala Ala Arg Tyr	Leu Lys Met Asn Gly	Lys Arg Arg Leu Leu
	385	390	395
10	Gly Ser Phe Asn His Gly Ser Met Ala	Asn Ala Met Pro Gln	Ala Leu
	405	410	415
	Gly Ala Gln Ala Thr Glu Pro Glu Arg	Gln Val Val Ala Met	Cys Gly
	420	425	430
15	Asp Gly Gly Phe Ser Met Leu Met Gly Asp Phe Leu	Ser Val Val Gln	
	435	440	445
	Met Lys Leu Pro Val Lys Ile Val Val Phe Asn	Asn Ser Val Leu Gly	
	450	455	460
20	Phe Val Ala Met Glu Met Lys Ala Gly Gly Tyr Leu Thr Asp Gly Thr		
	465	470	475
25	Glu Leu His Asp Thr Asn Phe Ala Arg Ile Ala Glu Ala Cys Gly Ile		
	485	490	495
	Thr Gly Ile Arg Val Glu Lys Ala Ser Glu Val Asp Glu Ala Leu Gln		
	500	505	510
30	Arg Ala Phe Ser Ile Asp Gly Pro Val Leu Val Asp Val Val Val Ala		
	515	520	525
	Lys Glu Glu Leu Ala Ile Pro Pro Gln Ile Lys Leu Glu Gln Ala Lys		
	530	535	540
35	Gly Phe Ser Leu Tyr Met Leu Arg Ala Ile Ile Ser Gly Arg Gly Asp		
	545	550	555
40	Glu Val Ile Glu Leu Ala Lys Thr Asn Trp Leu Arg		
	565	570	
45	<210> 3		
	<211> 1454		
	<212> DNA		
	<213> Escherichia coli		
50	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(1454)		
	<223> Mutagene DNA		
55	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (1)..(56)		
	<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz		
60	<220>		
	<221> misc_feature		
	<222> (57)..(577)		
	<223> Teil der 5'-Region (poxB1) des poxB-Gens		

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (578)..(646)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz
5
<220>
<221> misc_feature
<222> (647)..(1398)
<223> Teil der 3'-Region (poxB2) des poxB-Gens
10
<220>
<221> misc_feature
<222> (1399)..(1454)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz
15
<400> 3
ctagatgcat gctcgagcgg ccgccagtgt gatggatata tgcagaattc gcccttctga 60
acggtcttag tgacagtctt aatcgcatgg gcaccatcga gtggatgtcc acccgccacg 120
aagaagtggc ggcctttgcc gctggcgctg aagcacaact tagcggagaa ctggcggtct 180
gcgccggatc gtgcggcccc ggcaacctgc acttaatcaa cggcctgttc gattgccacc 240
gcaatcacgt tccggtactg gcgattgccg ctcatattcc ctccagcgaa attggcagcg 300
gctattttcca ggaaacccac ccacaagagc tattccgcga atgtagtac tattgcgagc 360
tggtttccag cccggagcag atcccacaag tactggcgat tgccatgcgc aaagcgggtgc 420
ttaaccgtgg cgtttcgggt gtcgtgttac caggcgacgt ggcgttaaaa cctgcgccag 480
25 aaggggcaac catgcaactgg tatcatgcgc cacaaccagt cgtgacgcgc gaagaagaag 540
agttagcga actggcgcaa ctgctgcgtt attccaggcc taagggcgaa ttccagcaca 600
ctggcgcccg ttactagtgg atccgagatc tgcagaattc gcccttctgc gtgcattgct 660
tccattggtg gaagaaaaag ccgatcgcaa gtttctggat aaagcgtgga aagattaccg 720
cgacgcccgc aaagggctgg acgatttagc taaaccgagc gagaaagcca ttcacccgca 780
30 atatctggcg cagcaaatta gtcattttgc cgccgatgac gctattttca cctgtgacgt 840
tggtacgcca acggtgtggg cggcacgtta tctaaaaatg aacggcaagc gtgcgctgtt 900
aggttcggtt aaccacggtt cgatggctaa cgccatgcgc caggcgctgg gtgcgcagcg 960
gacagagcca gaacgtcagg tggtcgccat gtgcggcgat ggcggtttta gcatgttgat 1020
gggcgatttc ctctcagtag tgcagatgaa actgccagtg aaaattgtcg tctttaacaa 1080
35 cagcgtgctg ggctttgtgg cgatggagat gaaagctggt ggctatttga ctgacggcac 1140
cgaactacac gacacaaact ttgcccgcat tgccgaagcg tgcggcatta cgggtatccg 1200
tgtagaaaaa gcgtctgaag ttgatgaagc cctgcaacgc gccttctcca tcgacgggtc 1260
ggtgttggtg gatgtggtgg tcgccaaaaga agagtttagc attccaccgc agatcaaact 1320
cgaacaggcc aaaggtttca gcctgtatat gctgcgcgca atcatcagcg gacgcggtga 1380
40 tgaagtgatc gaactggcaa gggcgaattc cagcacactg gcggccgtta ctagtggatc 1440
cgagctcggt acca 1454

<210> 4
45 <211> 1448
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
50 <221> misc_feature
<222> (1)..(3)
<223> Startkodon des delta poxB-Allels

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (1)..(605)
<223> 5'-Region des delta poxB-Allels

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (606)..(674)
<223> Technische DNA/Reste Polylinker-Sequenz

```

```

<220>
<221> misc feature
<222> (675)..(1445)
<223> 3'-Region des delta poxB-Allels
5
<220>
<221> misc feature
<222> (1446)..(1448)
<223> Stopkodon des delta poxB-Allels
10
<400> 4
atgaaacaaa cggttgcagc ttatatcgcc aaaacactcg aatcggcagg ggtgaaacgc 60
atctggggag tcacaggcga ctctctgaac ggtcttagtg acagtcttaa tcgcatgggc 120
accatcgagt ggatgtccac ccgccacgaa gaagtggcgg cctttgccgc tggcgctgaa 180
15 gcacaactta gcggagaact ggcggtctgc gccggtatcg gcggccccgc caacctgcac 240
ttaatcaacg gcctgttcga ttgccaccgc aatcacgttc cggtagctggc gattgccgct 300
catattccct ccagcgaaat tggcagcggc tatttccagg aaaccacccc acaagagcta 360
ttccgcgaat gtagtcacta ttgcgagctg gtttccagcc cggagcagat cccacaagta 420
ctggcgattg ccatgcgcaa agcgggtgctt aaccgtggcg ttccggttgt cgtgttacca 480
20 ggcgacgtgg cgttaaaacc tgcgccagaa ggggcaacca tgcaactggt tcatgcccga 540
caaccagtcg tgacgcgcga agaagaagag ttacgcaaac tggcgcaact gctgcgttat 600
tccaggccta agggcggaatt ccagcacact ggcggccggt actagtggat ccgagatctg 660
cagaattcgc ctttctgcgt gcattgcttc cattggtgga agaaaaagcc gatcgcaagt 720
ttctggataa agcgttgga gattaccgcg acgcccgaag agggctggac gatttagcta 780
25 aaccgagcga gaaagccatt caccgcgaat atctggcgca gcaaattagt cattttgccg 840
ccgatgacgc tattttcacc tgtgacgttg gtacgccaac ggtgtgggcg gcacgttatc 900
taaaaatgaa cggcaagcgt cgctgttag gttcgtttta ccacggttcg atggctaacg 960
ccatgccgca ggcgtgggt ggcgaggcga cagagccaga acgtcaggtg gtcgccatgt 1020
gcggcgatgg cggtttttagc atgttgatgg gcgatttctt ctcagtagtg cagatgaaac 1080
30 tgccagtga aattgtcgtc tttaacaaca gcgtgctggg ctttgtggcg atggagatga 1140
aagctgggtg ctatttgact gacggcaccc aactacacga cacaaacttt gcccgattg 1200
ccgaagcgtg cggcattacg ggtatccgtg tagaaaaagc gtctgaagtt gatgaagccc 1260
tgcaacgcgc cttctccatc gacgggtccg tgttggtgga tgtggtggtc gccaaagaag 1320
agttagccat tccaccgcag atcaaaactc aacaggccaa aggtttcagc ctgtatatgc 1380
35 tgcgcgcaat catcagcgga cgcggtgatg aagtgatcga actggcgaaa acaaaactggc 1440
taaggtaa
1448

```

Patentansprüche

1. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
5 durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das poxB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen
10 abschwächt, insbesondere ausschaltet,
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
15 g e k e n n z e i c h n e t, daß L-Threonin, L-Valin oder L-Lysin hergestellt wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
20 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
25 g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das poxB-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.

7.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende
gdhA-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe:
- 10 8.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-
Gen,
8.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-
Gen,
8.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfA,
15 8.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,
und
8.5 das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende pckA-Gen,
abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die
20 Expression verringert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Threonin den Stamm MG442ΔpoxB transformiert mit
dem Plasmid pMW218gdhA, dargestellt in Figur 2,
25 einsetzt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Threonin den Stamm MG442ΔpoxB transformiert mit
dem Plasmid pMW219rhtC, dargestellt in Figur 3,
30 einsetzt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Lysin den Stamm TOC21RΔpoxB einsetzt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h
5 g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Valin den Stamm B-12288ΔpoxB einsetzt.
13. L-Aminosäuren produzierende Mikroorganismen der Familie
Enterobacteriaceae, in denen das poxB-Gen oder dafür
kodierende Nukleotidsequenzen abgeschwächt,
10 insbesondere ausgeschaltet sind, die eine Resistenz
gegen α -Amino- β -Hydroxyvaleriansäure und gegebenenfalls
eine kompensierbare partielle Bedürftigkeit für L-
Isoleucin aufweisen.
14. Escherichia coli K-12 Stamm MG442ΔpoxB hinterlegt bei
15 der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und
Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) unter
der Nr. DSM 13762.
15. Plasmid pMAK705ΔpoxB, das Teile der 5'-und der 3'-Region
des poxB-Gens, entsprechend SEQ ID No. 3, enthält,
20 dargestellt in Figur 1.
16. Plasmid pMW218gdhA dargestellt in Figur 2.
17. Plasmid pMW219rhtC dargestellt in Figur 3.
18. Isoliertes Polynukleotid aus Mikroorganismen der
Familie Enterobacteriaceae, enthaltend eine für die 5'-
25 und 3'-Region des poxB-Gens kodierende
Polynukleotidsequenz dargestellt in SEQ ID No. 4
insbesondere geeignet als Bestandteil von Plasmiden für
die ortsspezifische Mutagenese des poxB-Gens.
19. L-Threonin produzierende Stämme der Familie
30 Enterobacteriaceae, enthaltend eine Mutation im poxB-
Gen entsprechend SEQ ID No. 4.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, in dem man folgende Schritte durchführt:

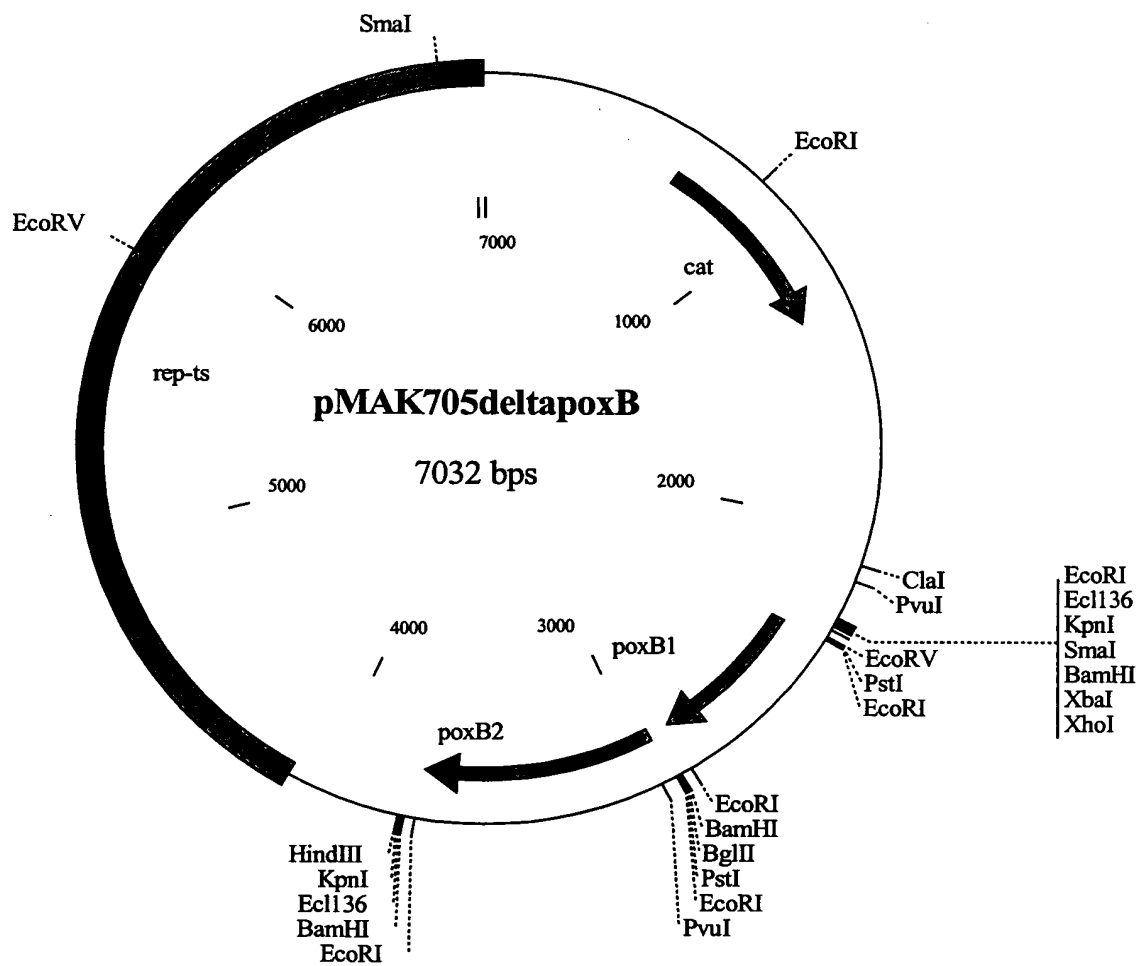
- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, in denen man zumindest das poxB-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet,
- 10 b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.

Figur 1:

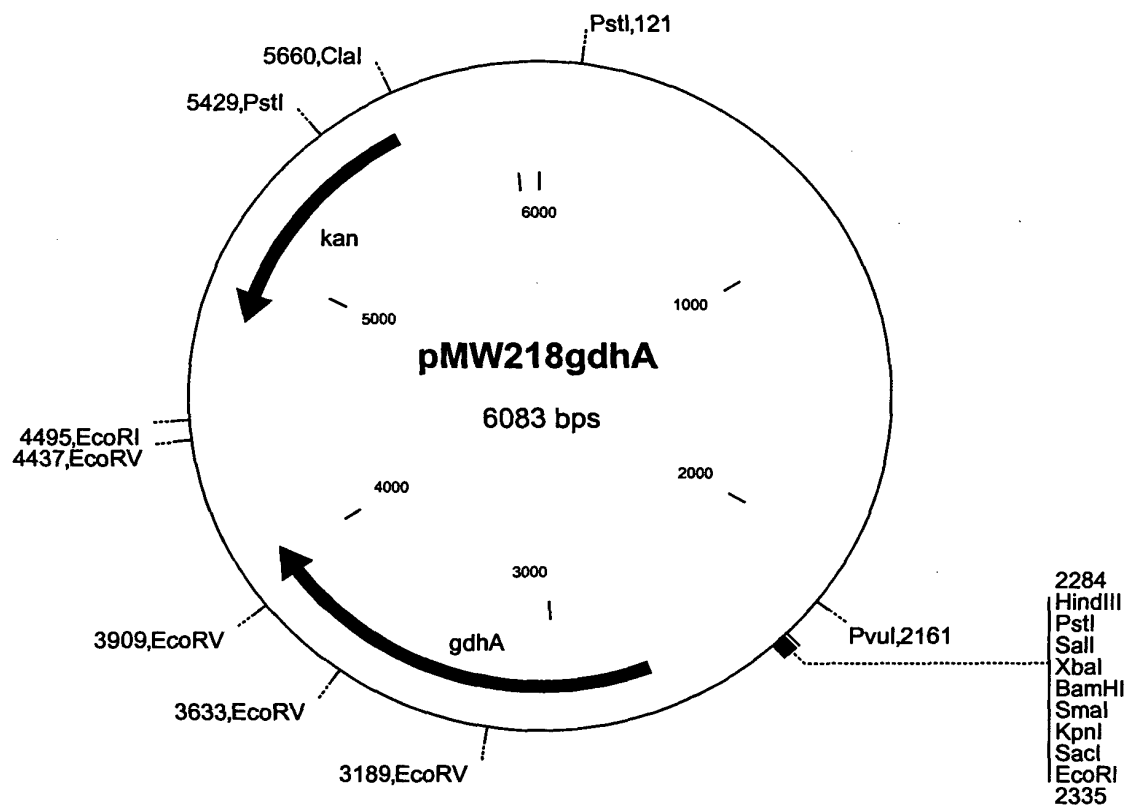
5

10

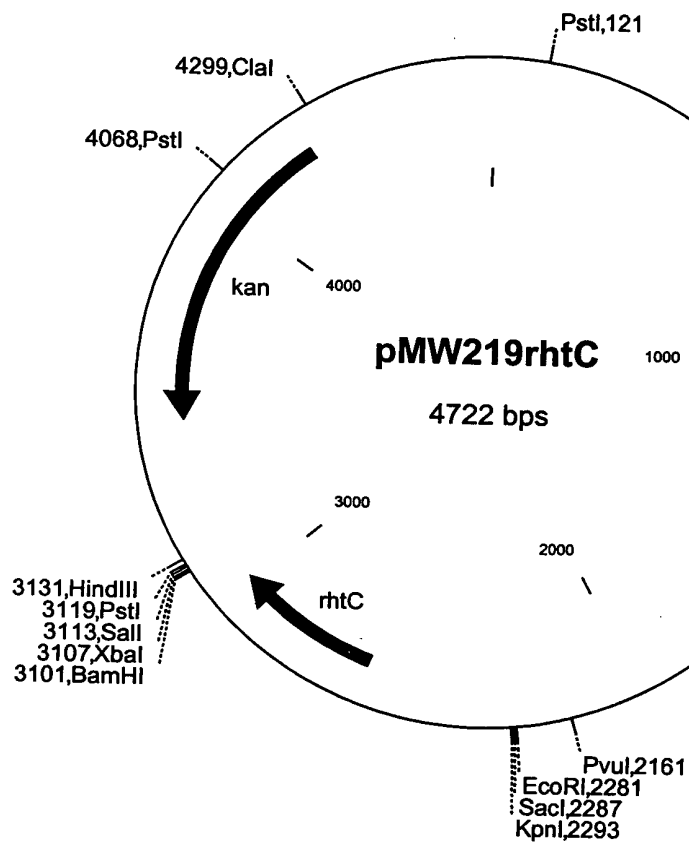
15



Figur 2:



Figur 3:



US 1007641604P1



Creation date: 19-08-2003
Indexing Officer: BBROWN8 - BARBARA BROWN
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 10076416

Legal Date: 03-04-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	2

Total number of pages: 2

Remarks:

Order of re-scan issued on